云 南 植 物 研 究 4(2):191—196, 1982
Acta Botanica Yunnanica

天麻发育过程中蛋白质、脂类及酶的组织化学定位初步观察*

刘 成 运
（中国科学院昆明植物研究所）

摘 要

天麻胚内含有丰富的脂肪及总蛋白质，少量的碱性蛋白质，胚体萌动时还显示出明显的多酚氧化酶，酯酶及 ATP 酶的活性。在营养生长期，顶端分生组织，叶原基，维管束薄壁细胞，外皮层细胞以及大型维管柱细胞内含有丰富的总蛋白质，其分布与贮存多糖的分布相反。脂肪及碱性蛋白含量不明显。顶端分生组织，表皮层及维管束薄壁细胞内呈现出酸性磷酸酶，酯酶，ATP 酶，多酚氧化酶及过氧化物酶较高的活性。开花期，球茎内这几种酶的活性均较高，在花序轴内 ATP 酶及过氧化物酶的活性比水解酶类的活性稍高些。球茎中央薄壁组织细胞由于贮存的多糖和蛋白质被逐渐消耗而形成空腔。果实成熟后，球茎内贮存的营养物质耗尽，酶类的活性显著下降。

天麻（*Gastrodia elata* Bl.）在整个发育周期中，除组织细胞发生形态和结构的变化外，细胞内的主要组成物质，如蛋白质，脂类、糖、核酸等在组织细胞中的分布和含量也随着发育的不同阶段而变化，它们对天麻个体生长与分化，即形态建成的过程产生非常重要的影响。观察这些物质在发育过程中的分布和动态，对深入了解天麻外部形态结构与内部生理功能之间的相互关系将是很有意义的。本文应用组织化学定位的方法，对天麻生长发育过程中（除有性生殖过程外）蛋白质、脂类及几种酶的分布动态作了初步的观察，多糖部分已另文报导[1]。

材 料 和 方 法

实验材料取自云南楚雄西山菌种厂人工瓶栽天麻及云南昭通地区野生天麻。两者通过实验观察，在组织细胞结构上无差异。萌动的幼胚是组织培养材料。具体方法如下：（1）蛋白质参考 Alfert (1953) 法[9]。样品固定在10%的中性福尔马林或卡诺氏 Carnoy's (1:3) 固定液内，石蜡切片，厚 8—10微米，制片经 5 %三氯醋酸90°C水解15分钟除去核酸，然后在 pH2.2 的条件下以固绿染色显示总蛋白，在 pH8.1 的条件下以固绿染色显示碱性蛋白。（2）脂类采用苏丹Ⅲ染色法[3]，新鲜组织经 5 %中性福尔马

本文于1981年 6 月19日收到。

* 段金玉先生惠赠天麻幼胚的组织培养材料，谨致感谢。

林固定后明胶包埋，冰冻切片，厚15微米，胚为整体染色。（3）酶类：酸性磷酸酶采用 Click 和 Fischer 法[4]。酯酶采用 Comori (Tween)法[8]。ATP 酶采用Wachstein, M. and E. Meisel 法[18]。过氧化物酶及多酚氧化酶采用 Click 法[5]。冰冻切片，厚10微米，部分采用徒手切片，厚约25微米。对照制片一律经沸水煮15分钟，然后与正式制片同时操作。

结果与讨论

1.蛋白质的分布与动态

成熟种子的种皮总蛋白含量不多，胚细胞质含有丰富的总蛋白质，而碱性蛋白含量不如总蛋白染色明显（图版Ⅰ：1—2）**。原球茎形成后，如能够及时地与蜜环菌（*Armillaria mellea* Fr.）建立营养关系，则球茎可及时获得异源营养，球茎细胞分裂迅速，在顶端分生组织，原形成层及大型维管柱（中柱）细胞内含有丰富的总蛋白质（图版Ⅰ：3,5）。如不能及时接菌，则球茎基部的营养茎（Vegetative stem）依靠消耗本身贮存的多糖和蛋白质使茎体极度伸长，以寻找菌源，最后因多糖及蛋白质耗尽终因饥饿而夭亡（图版Ⅰ：4）。总蛋白的分布特点和贮存多糖颗粒正相反，凡是生长旺盛，代谢活跃的组织细胞内不含多糖颗粒[1,2]，而总蛋白的含量却很丰富，如维管束薄壁细胞，伴胞及筛管分子内（图版Ⅰ：6）。表皮层发育的早期是一些生活机能较旺盛的薄壁细胞，具有较丰富的总蛋白及少量的多糖颗粒围绕在核的周围[1]，但在发育成熟后，失去核及原生质，细胞壁轻度木质化。但当年生长的球茎，其表皮层一般比较幼嫩，而营养茎表皮层则较木质化。表皮层内是6—7层细胞，最外一层为具有连续加厚外壁的外皮层细胞，细胞较大，排列整齐，具有丰富的总蛋白和明显的核（图版Ⅰ：7）。皮层组织内是维管柱组织，这是一些具有贮存功能的薄壁组织细胞及散生的外韧型的维管束所组成的天麻球茎的主体组织。这些薄壁细胞内含有很多贮藏多糖颗粒，总蛋白含量较低。含菌丝的皮层细胞为蜜环菌菌丝所侵占，细胞失去正常结构，菌丝被固绿染成淡绿色，总蛋白含量不高。与含菌丝细胞相邻的大型细胞却含有很丰富的总蛋白(图版Ⅰ：8)。天麻进入开花期，球茎依靠自身的贮藏物质供抽苔开花和结实，不再依靠异源营养。因此，当地下球茎生长出花序轴后，球茎首先自中央薄壁细胞内水解贮存的多糖颗粒[1]，通过筛管分子运往地上部分，随之蛋白质也被水解，细胞失去生活物质成为一空的细胞（图版Ⅰ：9）。最后，整个球茎中部成为一中空的腔。

2.脂类的分布和动态

天麻成熟的种子胚细胞内含有丰富的不饱和中性脂肪，呈油滴状分布在胚细胞质中，被苏丹Ⅲ染成桔红色（图版Ⅰ：10)。在球茎生活的薄壁细胞质中，只是偶尔观察到贮存的脂肪油滴，分布不普遍，含量亦较低。其它脂质类化合物如磷脂，固醇及糖甙脂

** 本文图版缩写：am：顶端分生组织， lp：叶原基， pc：原形成层， vb：维管束， ex：外皮层细胞，vc：维管束薄壁组织细胞， ph：韧皮部， x：木质部， e：胚， s：种皮， hc：含菌丝皮层细胞，gc：大型细胞， ek：外表皮， co：皮层细胞， n：核。

类多与蛋白质结合形成复合体构成植物细胞膜系统和细胞壁的某些成分，如木栓质和角质。在真菌菌丝内含有丰富的固醇类脂质化合物。通过苏丹Ⅲ染色，观察到含菌丝的皮层细胞内菌丝及细胞核被染成棕红色，其中有一些桔红色物质（图版Ⅰ：1 白色箭头）。这些结果可能与核膜含有磷脂类及固醇类物质有关，而菌丝可能和含有麦角固醇（Ergosterol）、脂质类物质有关。但由于核膜及菌丝仅仅是含有脂质类物质的成分，并不像油脂滴那样单纯，所以苏丹Ⅲ染色结果并不是很典型的桔红色。

3.酶类的组织化学定位结果

对天麻组织中各个发育阶段里呼吸酶类，水解酶类及能量移换酶类的分布和动态初步观察的结果，发现胚细胞在萌动开始后，这些酶类均表现出较高的活性分布，特别是多酚氧化酶（图版Ⅱ：3），脂酶（图版Ⅰ：10），及 ATP 酶。脂肪被水解后转化为糖供种胚萌发形成原始球茎时利用，同时也为旺盛的呼吸作用提供原料并产生大量能源。在营养生长阶段，生长旺盛的顶端分生组织，叶原基，原形成层组织细胞内的 ATP 酶，酸性磷酸酶及呼吸酶类均有较高的活性分布（图版Ⅱ：4）。在维管输导系统，如发育成熟的韧皮部薄壁细胞，筛管分子，伴胞及木薄壁细胞内均显示了呼吸酶类，水解酶类及 ATP 酶较高的活性（图版Ⅱ：5—9）。花序轴形成后，其维管束内 ATP 酶及呼吸酶类的活性要略高于水解酶类。其原因可能是花序轴内所输送的营养物质是一些可溶性小分子物质，这些物质在通过轴内维管束时需要借助于呼吸作用产生大量 ATP 来供应足够的能量，而在地下部球茎内维管薄壁细胞需要大量水解酶类将贮藏的大分子有机物质水解成可溶性小分子，并通过克服浓度梯度进入筛管分子，这样又必须供应大量的 ATP。所以在维管束薄壁细胞内存在大量的线粒体[2]，这些酶类及线粒体的存在与物质的运输功能是有密切关系的。天麻的表皮层具有明显的上述各种酶类的活性，这些分布特点是和天麻球茎的地下生活环境有关的。因为天麻既无根系又无枝叶，单纯地仅仅依靠消化入侵的真菌菌丝是不能满足整个营养需要的，它必须通过与土壤相接触的表皮层吸取土壤中的水分和溶于水的无机盐类，因此表皮层就具有与吸收功能相关的一些酶类的活性分布。在制片中，有时可以观察到某些表皮层细胞向外延伸形成根毛状以增加吸收面积，关于酸性磷酸酶与 ATP 酶在植物体中的分布和生理作用，已有很多的报道[6,7,10—18]，这些作者通过玉米，小麦、烟草、南瓜及木本植物等不同的植物均观察到这两种酶主要分布在与物质离子的吸收与运转有关的组织细胞中，特别是韧皮部薄壁细胞，筛管，伴胞及传递细胞中。在上述天麻组织细胞中也同样地观察到了与这些作者所述的相同分布特点。这些酶的活性沉淀物大多是沿细胞壁及相当于细胞质膜的解剖位置分布以及沿着其它细胞内含物的表面沉积，但由于光学组织化学的粗糙性，尚无法进行精确地定位。天麻种子成熟后，球茎内贮藏的营养物质已耗尽，球茎中部成为空腔，只有表皮层及皮层尚能保持一段时间生活机能。如球茎表皮及皮层内侵染了蜜环菌菌索或菌丝，此时菌索可深入侵染至球茎中央空腔内，而退化鳞片叶叶腋处的休眠芽，可以复苏而萌发，与蜜环菌建立营养关系后，可以成长为一新的天麻球茎。如球茎表皮或皮层未能附有蜜环菌菌索，则球茎迅速溃烂，结束生命活动。

总之，通过天麻发育过程中细胞内含主要生命物质的动态，了解到由于不同生长发育阶段生理功能的不同，表现在细胞内主要生命物质的分布及含量也就不同，在内部生

理生化变化的基础上，组织细胞的形态结构也就发生与之相适应的变化以完成不同生长发育阶段生理功能的需要。外部形态结构和内部的生理功能是有机的统一在整个生命活动过程之中的。

参 考 文 献

〔1〕刘成运，1981：云南植物研究，3(3)：375—380.
〔2〕———，1981：植物学报，23(2)：92—96.
〔3〕郑国锠，1978：生物显微技术，106—156页．人民教育出版社.
〔4〕俞大绂，1977：植物病理学和真菌学技术汇编，996—999页．人民教育出版社.
〔5〕郭季芳，1964：植物生理学通讯，2：52—55.
〔6〕———，1964：植物学报，12(1)：100—106.
〔7〕简令成、董合铸、孙龙华，1980：实验生物学报，13(2)：135—139.
〔8〕赤堀四郎，1961：酵素研究法4，朝仓书店，637—639页.
〔9〕Alfert M. and Irving I. Geschwing 1953: Proc. Nat. Acad. Sci., 39(10): 991—999.
〔10〕Bentwood, B. J. and J. Cronshaw, 1978: Planta (Berl.) 140: 111—120.
〔11〕Bentwood, B. J. and J. Cronshaw, 1976: Planta (Berl.) 130: 97—104.
〔12〕Figier, J., 1972: Planta (Berl.) 180: 215—226.
〔13〕Gardnor, D. C. J. and A. J. Pecs, 1969: Nature (Lond) 222: 774.
〔14〕Gilder, J. and J. Cronshaw, 1974: J. Cell Biolo., 60: 221—235.
〔15〕Lester, H. H., and R. F. Evert, 1965: Planta (Berl.) 65: 180—185.
〔16〕Rogerw. Parish, 1975: Planta (Berl.) 123: 15—31.
〔17〕Sexton, R. and J. F. Satclifte, 1969: Ann. Bot., 33: 683—694.
〔18〕Wachstein, M. and E. Meisel, 1957: Ph. Amer. J. Clin. Path., 27: 13—23.

SOME PRIMARY OBSERVATIONS ON THE HISTOCHEMICAL LOCALIZATION OF PROTEINS, LIPOIDS, AND ENZYMES IN THE DEVELOPMENT PROCESS OF GASTRODIA ELATA

Liu Chengyun

(Kunming Institute of Botany, Academia Sinica)

Abstract

In the embryo of *Gastrodia elata* Bl., the richer fat, cytoplasmic protein and trace basic protein were found, and also visible activities of peroxidase, esterase and ATPase were detected, when the sprout.

While the vegetative growth, richer protein were found in the apical meristem, leaf primordium, parenchyma cells of vascular bundle, exodermis cells and great cells. The distribution of protein was contrary to the distribution of storage polysaccharide. The content of basic protein and fat was not notable.

Higher activities of acid phosphatase, esterase, ATPase, peroxidase, and polyphenol oxidase were presented in the apical meristem, epidermal, and paren-chyma cells of vascular bundle.

In the corm stem the activities of some enzymes were higher during the flowering stage. The activities of polyphenol oxidase and ATPase were higher than that of hydrolase in the floral axis. The central parenchyma of corm stem changed into empty cavity because storage polysaccharide and protein were gradually consumed.

After maturation of fruits the nutrient substances were exhausted in corm stem, consequently the activity of enzymes decreased notably.

EXPLANATION OF PLATES

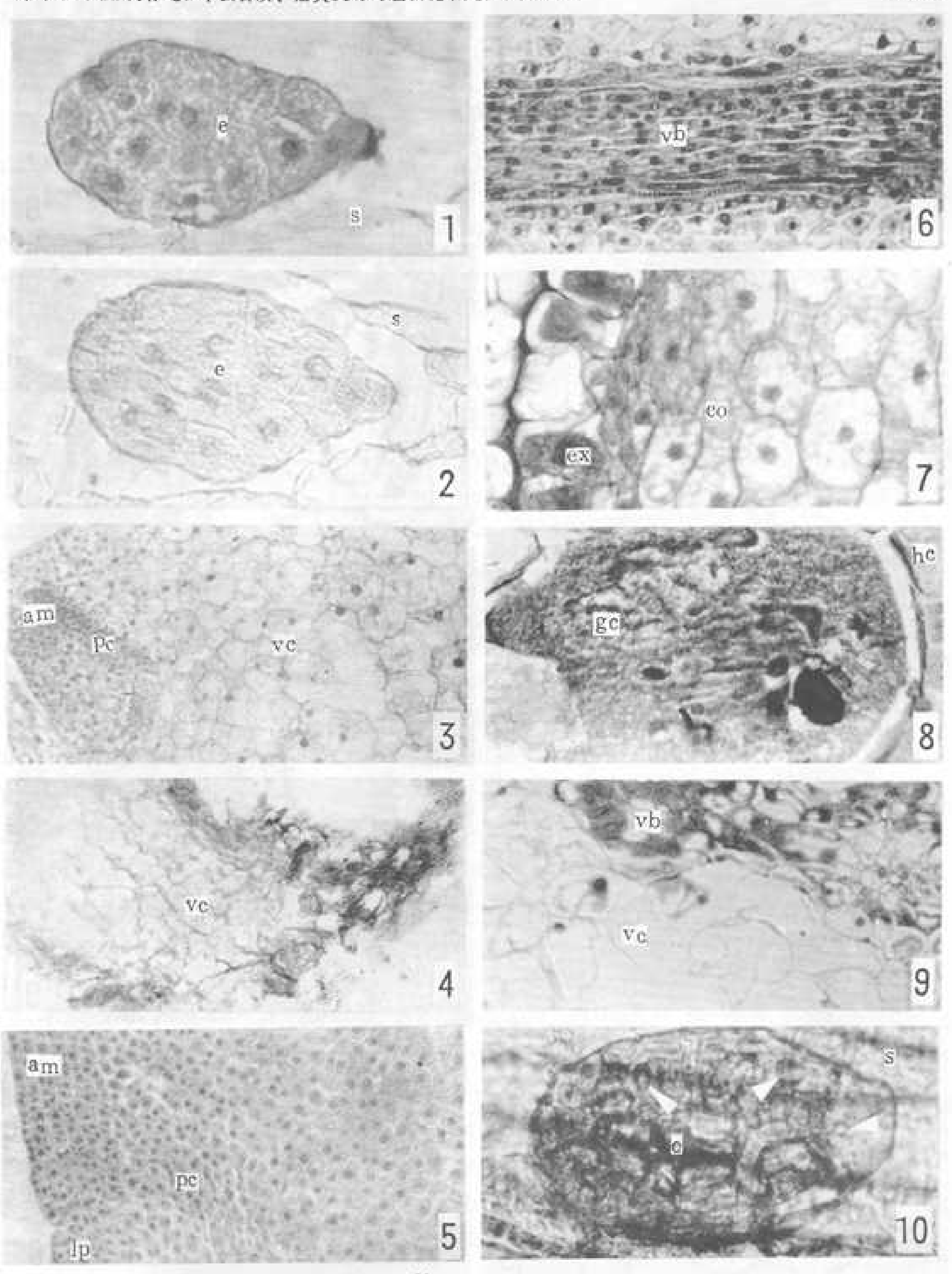
Legends: am-apical meristem, lp-leaf primordium, pc-primary cambium, vb-vascular bundle, ex-exodermis cells, vc-vascular cylinder cells, ph-phloem, x-xylem, e-embryo, s-seed skin, hc-hyphal coils, gc-great cells, co-cortex, n-nucleus.

PLATE I

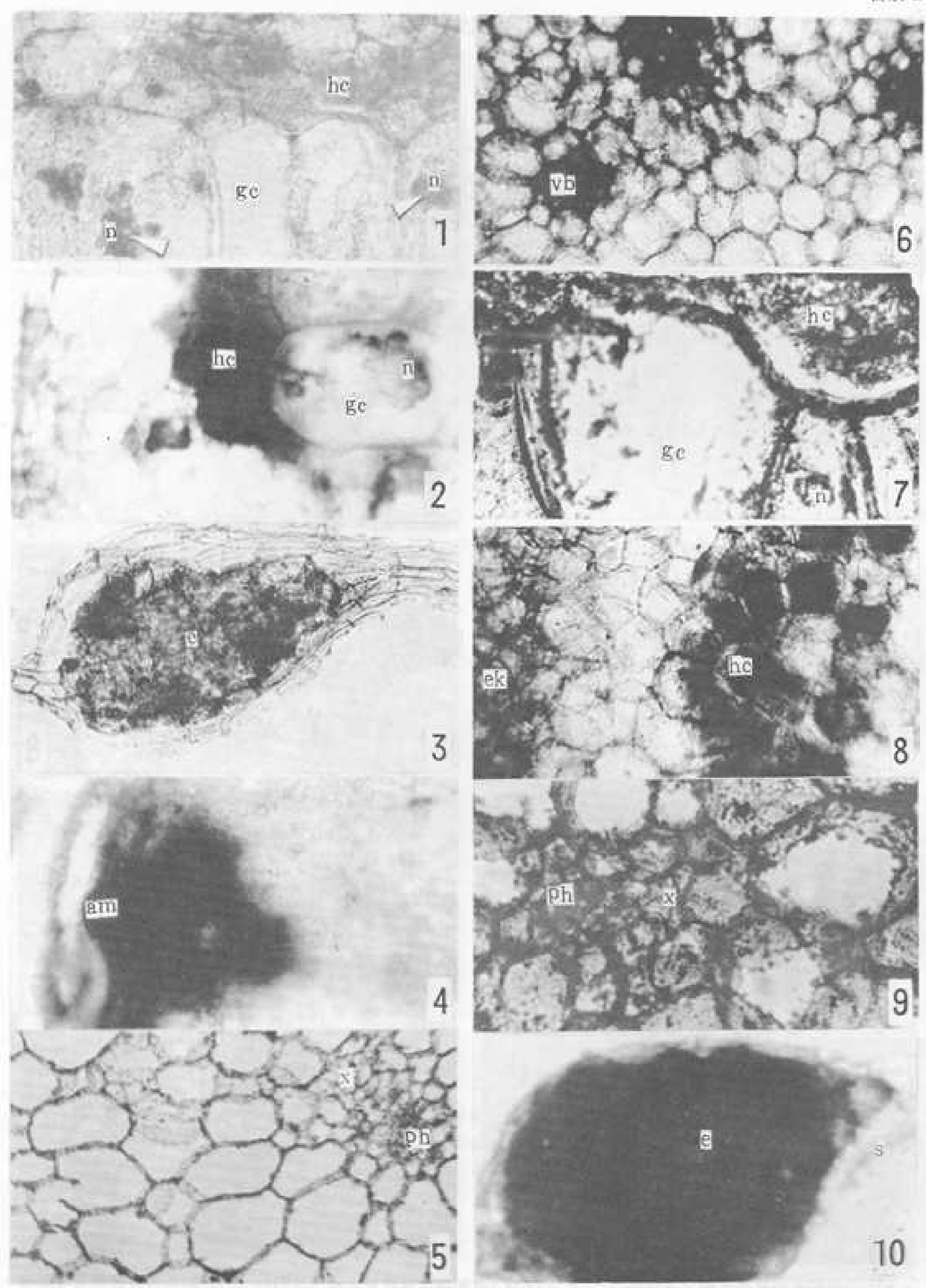
1. Cytoplasimic protein at pH2.2 in the embryo. 2. Basic protein at pH8.1 in the embryo. 3. Protocorm of infected hyphae has a richer protein. 4. The protein was exhausted in the vegetative stem of die young. 5. Richer protein were found in the cells of apical meristem. 6. Richer protein were found in the parenchyma cells of vascular bundle. 7. Richer protein were found in the exodermis cells. 8. Richer protein were found in the great cells. 9. After the fruit was riped contaning trace protein in the vascular cylinder cells. 10. Richer fat was found in the embryo.

PLATE II

1. The nuclei, collapsed nuclei and infected hyphae had stained of lipid with a red-brown color. 2. Higher activity of polyphenol oxidase were shown in the cortical cells of infected hyphae and great cells. 3. Higher activity of peroxidase was shown in the sprouted embryo. 4. Higher activity of ATPase were shown in the apical meristem. 5. Higher activity of ATPase were shown in the parenchyma cells of vascular bundle. 6. Higher activity of ATPase was shown in the floral axis. 7. Higher activity of ATPase were shown in the cotical cells of infected hyphae and great cells. 8. Higher activity of acid phosphatase were shown in the epidermal and cortical cells of infected hyphae. 9. Higher activity of acid phosphatase were shown in the parenchyma cells of vascular bundle. 10. Higher activity of esterase was shown in the sprouted embryo.



1.在pH2.2时胚内的总蛋白质（×210）；　2.在pH8.1时胚内的碱性蛋白质（×210）；　3.及时接菌的原球茎有较丰富的总蛋白质（×210）；4.夭亡的营养基内蛋白质已耗尽（×210）；　5.顶端分生组织细胞内含有丰富的总蛋白质（×420）；　6.维管束薄壁组织细胞内含有较丰富的总蛋白质（×210）；　7.外皮层细胞内含有较丰富的总蛋白质（×210）；　8.大型细胞内含有较丰富的总蛋白质（×420）；　9.果实成熟后维管束薄壁细胞内含有很微量的总蛋白质（×210）；　10.胚细胞内含有很丰富的脂肪滴（×210）.



1.细胞核，崩解细胞核及侵染的菌丝有红棕色的脂类染色（×210）；2.在含菌的皮层细胞及大型细胞内显示了过氧化物酶较高的活性（×210）；3.在萌发的胚内显示了较高的多酚氧化酶的活性（×210）；4.在顶端分生组织内显示了ATP酶较高的活性（×210）；5.在维管束薄壁组织细胞内显示了ATP酶较高的活性（×210）；6.在花序轴内显示了ATP酶较高的活性（×210）；7.在含菌丝的皮层细胞及大型细胞内显示了ATP酶较高的活性（×210）；8.在表皮层及含菌丝的皮型细胞内有较高的酸性磷酸酶活性（×210）；9.在维管束薄壁组织细胞内有较高的酸性磷酸酶的活性（×420）；10.在萌发的胚内有较高的脂酶的活性（×210）.